Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Chemische Zusammensetzung menschlichen Lungengewebes und ihre Veränderung mit dem Lebensalter

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Elvira Ruff

aus Dresden

1965

8141

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität
Tübingen
Direktor: Professor Dr.Dr. G. Weitzel

Chemische Zusammensetzung menschlichen Lungengewebes und ihre Veränderung mit dem Lebensalter

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Elvira Ruff
aus Dresden
1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Dekan:	Professor Dr. W. S c h u l t e
1. Berichterstatter:	Professor Dr. E. B u d d e c k e
	Professor Dr. Dr. G. W e i t z e l
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. G r a u m a n n

Herrn Professor Dr.Dr. G. W e i t z e l bin ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Physiologisch-chemischen Institut zu besonderem Dank verpflichtet.

Für die freundliche Überlassung des Themas und für die grosszügige Unterstützung bei seiner Bearbeitung möchte ich Herrn Professor Dr. E. B u d d e c k e meinen verbindlichsten Dank sagen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung und Fragestellung 5

II. Ergebnisse 8

a) Kollagen-, Elastin- und Hexosamingehalt menschlichen Lungengewebes in verschiedenen Altersklassen 8

b) Saure Mucopolysaccharide (Glycosaminoglycane) und Glykoproteide des menschlichen Lungengewebes in verschiedenen Altersklassen 15

c) Veränderungen des Spektrums der sauren Mucopolysaccharide menschlichen Lungengewebes in Abhängigkeit vom Lebensalter 19

d) Isolierung, chemische Zusammensetzung und Identifizierung verschiedener saurer Mucopolysaccharide aus Lungengewebe des Menschen. 21

III. Beschreibung der Versuche 28

a) Untersuchungsgut 28

b) Analytische Methoden 28

1. Hexosaminbestimmung 28
2. Kollagenbestimmung 29
3. Elastinbestimmung 30
4. Isolierung der Gesamtmucopolysaccharide . 31
5. Saure Mucopolysaccharide 31
6. Glycoproteide 32
7. Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide 32
8. ECTEOLA-Cellulose-Chromatographie 32

IV. Diskussion 33

V. Zusammenfassung 36

VI. Literatur 37

I. Einleitung und Fragestellung

Die morphologische Struktur des Lungenbindegewebes ist durch verschiedene Zelltypen, kollagene, reticuläre und elastische Fasern sowie die lichtoptische homogene Grundsubstanz gekennzeichnet und entspricht damit dem allgemeinen Bauprinzip mesenchymaler Gewebe. Die chemischen Merkmale des Bindegewebes bestehen im allgemeinen in einem Überwiegen der extrazellulären Gewebeanteile, wie z.B. der Faserproteine und der Polysaccharid-Proteine der Grundsubstanz, unter quantitativem Zurücktreten zellulärer Elemente. Diese Verteilung spiegelt sich auch im Elektrolytgehalt wieder: so ist der Na-Gehalt des Lungenbindegewebes - wie bei allen bindegewebigen Organen - mit 244 mg % doppelt so hoch wie der K-Gehalt (147 mg % Frischgewicht).

Untersuchungen über die Veränderung der chemischen Zusammensetzung des menschlichen Lungenbindegewebes erfordern das Arbeiten mit topographisch definierten Gewebsanteilen und hat den vorliegenden Ergebnissen der Histologie und Pathologie Rechnung zu tragen. Betrachtet man das alveoläre Lungengewebe als den entscheidenden funktionellen Anteil der Lunge, so ergibt sich für den morphologischen Bau des bindegewebigen Anteils folgendes: das bindegewebige Grundgerüst der Alveolarwand ist ein Teil des sich durch das Gesamtorgan erstreckenden funktionellen Systems, das etwa zu gleichen Teilen aus einem Netzwerk elastischer und kollagener sowie Gitterfasern besteht, die in die lichtoptisch homogene Grundsubstanz eingebettet sind. Die Alveolarwand selbst wird von einem elastischen Faserwerk umgeben, das eine reversible Dehnung bis zum dreifachen des ursprünglichen Durchmessers gestattet. Die wichtigste funktionelle Aufgabe fällt den elastischen Fasern zu, die für die Elastizität und somit für die beatmete Oberfläche der Alveolen verantwortlich sind. Nach Bargmann (1) manifestieren sich die Altersveränderungen des Lungengewebes in erster Linie am Bindegewebsapparat, wobei bei der Rückbildung besonders die elastischen Fasern betroffen sind. Hierbei kommt es zu Fragmentation und Abbau

unter allgemeinem Bindegewebsschwund, von dem besonders die Alveolarsepten betroffen werden. Als Folge dieses Prozesses entwickelt sich unter Bildung grösserer Luftkammern das senile Emphysem. Hyronymi (2) kommt zwar zu dem Ergebnis, dass eine zahlenmässige Abnahme der elastischen Fasern nicht nachweisbar sei und auch deren Breite bis zum 60. Lebensjahr konstant bleibt, doch betreffen die Umbauprozesse der Lungenacini eine Dickenabnahme der Alveolenwand, sowie eine vom 40. Lebensjahr an beginnende Zellverarmung.

Die Erkenntnis, dass Lungenbindegewebe bestimmten physiologischen Alterswandlungen unterworfen ist und an verschiedenen pathologischen Prozessen (wie z.B. der Lungenfibrose) massgeblich beteiligt ist, hat zu chemischen Untersuchungen Anlass gegeben, die jedoch noch viele Fragen offenlassen. So wurde der Kollagen- und Elastingehalt schon mehrfach untersucht (3, 4, 5, 6). Die gewonnenen Ergebnisse weichen jedoch stark voneinander ab, was durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden und unterschiedliches Untersuchungsgut erklärt werden muss. J.A. Pierce und J.B. Hocott (3) kommen zu dem Ergebnis, dass der Elastingehalt menschlicher Lungen mit zunehmendem Lebensalter ansteigt, und zwar von 2 - 4 % (0 - 10 Jahre) auf 10 % (Trockengewicht) (70 - 80 Jahre). Da diese Werte jedoch aus ganzen Lungenlappen (Mittellappen) ohne Entfernung der Bronchien und ohne Auswaschung des Blutes gravimetrisch nach einmaliger Extraktion des Kollagens aus dem Trockengewebe gewonnen wurden, besteht die Möglichkeit, dass in der von den Autoren als Elastin gewonnenen Substanz noch beträchtliche Mengen ungelösten Kollagens enthalten sind. Die sehr niedrigen Werte für Kollagen, mit einer Schwankungsbreite zwischen 5 und 20 % des Lungentrokkengewebes, deuten jedenfalls darauf hin. Ebenso fanden Scarselli und M. Repetto (4) mit zunehmendem Lebensalter ein Ansteigen des Elastingehaltes. Demgegenüber stellten J. Boucek, N.L. Noble und A. Marks (5) bei Anwendung verschiedener Bestimmungsmethoden für den Kollagen/Elastin Quotienten fest, dass bei einem Untersuchungsgut in einem Altersbereich zwischen 0 und 75 Jahren der Elastingehalt - bestimmt als

Rückstand nach Druckerhitzung - mit dem Alter signifikant abnimmt und dass eine scheinbare Zunahme des elastinhaltigen Rückstandes nach Trichloressigsäureextraktion durch zunehmende Verfestigung und Unlöslichkeit der Kollagenfasern bedingt ist, die in "quasi kristallinem" Zustand mit Elastin ein Copolymerisat bilden.

Angaben über Untersuchungen der Grundsubstanz menschlichen Lungenbindegewebes und über den Gehalt an Polysacchariden und deren Veränderung in Abhängigkeit vom Lebensalter fehlen bisher. Lediglich das Problem der Lungenfibrose, insbesondere der Silikose wurde sowohl an menschlichen Lungen wie in Tierexperimenten studiert mit dem Ergebnis, dass es unter Einwirkung von SiO_2 zu starken reaktiven Veränderungen und zur Vermehrung des Bindegewebes kommt. M. Chvapil (7)stellte z.B. für Ratten mit experimenteller Silikose einen Anstieg der Mucopolysaccharide mit zunehmendem Silikosegrad fest. Die zahlreichen Untersuchungen über die Mucopolysaccharide tierischer Lungen (8,9) stehen vor allem im Zusammenhang mit der Heparingewinnung und der Charakterisierung hierbei erhaltener Nebenfraktionen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einer chemischen Analytik des Bindegewebes der menschlichen Lunge. Im 1. Teil werden Daten über den Gehalt an Hexosamin als Masstab für die Mucopolysaccharidgewebskonzentration und den Skleroproteinen Kollagen und Elastin vorgelegt. Dabei werden die den Altersprozessen zugrundeliegenden Gesetzmässigkeiten ermittelt und einer statistischen Auswertung unterzogen.

Im 2. Teil der Arbeit wird die Isolierung der sauren Mucopolysaccharide [+)] (Glycosaminoglycane) und Glykoproteine der

---

[+)] Im internationalen Schrifttum werden auch die synonymen Bezeichnungen anionische Heteropolysaccharide, Mucoproteine u.a. verwendet. Die in der vorliegenden Arbeit benutzte Terminologie entspricht neueren Nomenklaturvorschlägen (M. Florkin u. E.H. Stotz, Comprehensive Biochemistry, Vol. 5, Carbohydrates, S. 262 ff; Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York, 1963), in denen die Begriffe acidic glycosaminoglycanes bzw. acidic mucopolysaccharides empfohlen werden.

strukturlosen Grundsubstanz des Lungenbindegewebes und ihre quantitative Verteilung sowie die Änderung ihres Verteilungsmusters in verschiedenen Altersklassen beschrieben. Über einzelne saure Mucopolysaccharide, die in reiner Form dargestellt und aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung identifiziert werden, wird berichtet.

II. Ergebnisse

a) Kollagen-, Elastin- und Hexosamingehalt menschlichen Lungengewebes in verschiedenen Altersklassen

Für die Untersuchung über Altersveränderungen, die sich am Bindegewebsapparat manifestieren, wurde eine quantitative Erfassung der beiden Hauptkomponenten des Bindegewebes, der Faserproteine und der hexosaminhaltigen Zwischenzellsubstanz sowie die Bestimmung ihrer Mengenkorrelation vorgenommen. Diese Untersuchungen wurden an 71 Lungengewebsproben durchgeführt. Die nach den im Abschnitt III beschriebenen Methoden gewonnenen Ergebnisse für den Kollagen-, Elastin- und Gesamthexosamingehalt sind in den Tabellen 1 - 4 zusammengestellt. Die in den Tabellen 2 - 4 unter I - IV aufgeführten Untersuchungsgruppen sind nach folgenden Altersklassen zusammengefasst: I = 0 - 0,5 Jahre, II = 18 - 37 Jahre, III = 50 - 58 Jahre, IV = 61 - 77 Jahre. Eine Übersicht über die erhaltenen Einzelwerte geben ferner die Abbildungen 1 - 3.

Tabelle 1

Gesamthexosamin-, Kollagen- und Elastinwerte menschlicher Lungen (Doppelbestimmungen). Angaben in % des Trockengewichtes.

Alter m/w	Hexosamin in % der Einwaage		Kollagen in % der Einwaage		Elastin in % der Einwaage	
	Einzelbest.	Mittelwert	Einzelbest.	Mittelwert	Einzelbest.	Mittelwert
0 - ½	0.460 0.305 0.285 0.345 0.335 0.280 0.256 0.295 0.270 0.510	0.3825 ±0.077 0.315 ±0.03 0.307 ±0.028 0.275 ±0.02 0.39 ±0.12	12.0 12.1 9.8 10.4 17.5 14.4 13.4 10.0 11.1 15.0	12.05 ±0.05 10.10 ±0.30 15.95 ±1.55 11.70 ±1.70 13.05 ±1.95	13.30 13.00 11.80 12.00 10,90 10.40 15.10 15.20 14.20 13.30	13.15 ±0.15 11.90 ±0.01 10.65 ±0.25 15.15 ±0.05 13.75 ±0.45
18 m	0.520 0.391	0.45 ±0.07	28.0 21.6	24.80 ±3.20	12.80 13.42	13.11
25 m	0.405 0.450	0.427 ±0.023	19.8 21.8	20.80 ±1.00	10.90 99,88	10.38 ±0.52
28 w	0.212 0.235	0.223 ±0.012	22.02 20.06	21.040 ±0.98	11.40 12.10	11.75 ±0.35
31 w	0.456 0.440	0.448 ±0.008	36.5 24.6	30.55 ±5.95	8.75 9.85	9.35 ±0.50
34 w	0.321 0.445	0.403 ±0.089	33.3 34.1	33.70 ±0.40	12.85 10.80	11.97 ±0.88
37 m	0.315 0.492	0.403 ±0.089	22.75 22.05	22.40 ±0.35	8.05 8.60	8.32 ±0.275
37 m	0.544 0.315	0.421 ±0.115	22.3 17.85	20.07 ±2.23	7.85 8.10	7.975 ±0.125
50 w	0.690 0.545	0.617 ±0.073	20.00 21.2	20.60 ±0.60	12.70	12.7
55 m	0.620 0.548	0.584 ±0.036	21.4	21.40	12.20 9.40	10.3 ±1.9
57 m	0.620 0.415	0.517 ±0.103	24.0 23.15	23.75 ±0.43	9.75 9.60	9.63 ±0.12

Alter	m/w	Hexosamin in % der Einwaage		Kollagen in % der Einwaage		Elastin in % der Einwaage	
		Einzel-best.	Mittel-wert	Einzel-best.	Mittel-wert	Einzel-best.	Mittel-wert
57	w	0.620 0.560	0.60 ±0.02	22.0 23.8	22.90 ±0.90	10.00	10.00
57	m	0.470 0.365	0.417 ±0.053	22.0 22.0	22.00	13.30	13.30
58	m	0.565 0.668	0.616 ±0.048	16.4 15.7	16.05 ±0.35	10.80 11.70	11.25 ±0.045
58	w	0.440 0.475	0.457 ±0.018	26.2 20.5	23.35 ±2.85	8.80 9.10	8.95 ±0.15
61	w	0.300 0.331	0.315 ±0.016	22.5 28.7	25.60 ±3.10	9.85 10.17	10.01 ±0.16
64	w	0.810 0.700	0.755 ±0.055	22.5	22.50	10.60 11.20	10.04 ±0.08
65	w	0.600 0.460	0.503 ±0.97	22.0 18.5	20.25 ±1.75	9.60 8.60	9.10 ±0.50
68	w	0.347 0.350	0.35 ±0.005	26.0 27.5	26.75 ±0.75	10.81 9.35	10.08 ±0.73
72	w	0.620 0.515	0.567 ±0.053	27.0 20.7	23.80 ±3.10	9.80 10.60	10.20 ±0.40
72	m	0.380 0.520	0.45 ±0.07	23.4 28.0	25.70 ±3.30	9.85 12.90	11.37 ±1.52
73	w	0.295 0.336	0.315 ±0.021	25.25 23.6	24.42 ±0.82	8.55 9.40	8.925 ±0.475
73	m	0.466 0.440	0.453 ±0.013	24.5	24.50	8.25 10.90	9.575 ±1.325
74	w	0.326 0.436	0.378 ±0.052	23.1 23.5	23.30 ±0.20	8.85 9.40	9.125 ±0.275
75	m	0.375 0.380	0.377 ±0.005	20.0 23.0	21.50 ±1.50	8.40 9.75	9.525 ±0.225
76	m	0.336 0.380	0.385 ±0.022	22.1	22.10	10.80 10.20	10.50 ±0.30
77	m	0.340 0.548	0.444 ±0.104	22.7	22.70	8.90 10.80	9.85 ±0.95
77	m	0.488 0.340	0.414 ±0.074	28.75 24.25	26.50 ±2.25	9.65 10.20	9.475 ±0.725

Bei den Faserproteinen zeigen Kollagen und Elastin eine gegenläufige altersabhängige Bewegung. Für das Kollagen wurde in einem Altersbereich von 0 - 1/2 Jahre ein Durchschnittswert von 12.57 % gefunden. Mit zunehmendem Alter erfährt der Kollagengehalt einen Anstieg, jedoch ist dieser lediglich während der ersten beiden Lebensdezennien nachweisbar und trotz starker Schwankungen der Einzelwerte auch statistisch zu sichern ($p = I - II < 0{,}01$). Vom 3. bis 7. Lebensjahrzehnt bleibt das Kollagenniveau dann annähernd konstant. Im ganzen steigt der Kollagengehalt - wie aus den Durchschnittswerten der Tabelle 2 zu entnehmen ist - im Laufe des Lebens auf etwa das Doppelte an.

Tabelle 2

Kollagengehalt menschlichen Lungengewebes. Angaben in % des Trockengewichtes. Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes (I). Mittlerer Fehler der Einzelmessung (II).

		I	II
Altersklasse	Anzahl der Proben	Kollagen	Mittlerer Fehler der Einzelm.
I	10	12.57 ± 0.77	±2.45
II	14	24.77 ± 1.30	±4.92
III	13	21.55 ± 0.79	±2.9
IV	22	24.00 ± 0.60	±2.8

Gegensätzliches Verhalten zeigt das Elastin, das mit steigendem Lebensalter eine kontinuierliche Abnahme erfährt, obwohl die Gesamtabnahme von 8.41 auf 6,95 nur 30 % beträgt. Die Differenz der Werte ist auch hier (bis auf die Unterschiede der Gruppe III und IV) statistisch signifikant.

Tabelle 3

Elastingehalt menschlichen Lungengewebes. Gravimetrisch bestimmte Werte, Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes (I). Mittlerer Fehler der Einzelmessung (II). Auf theoretischen Stickstoffgehalt korrigiertes Elastin, Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwertes (III). Angaben in % des Trockengewichtes.

		I	II	III
Altersklasse	Anzahl d. Proben	Elastin grav.	Mittlerer Fehler der Einzelmess.	Elastin (korrigiert)
I	10	12.92±0.525	±1.66	8.41±1.08
II	14	10.82±0.53	±2.0	7.76±0.91
III	11	10.67±0.48	±1.63	7.01±1.21
IV	26	9.98±0.063	±1.05	6.95±0.73

Die aus den Tabellen 1 - 4 abgeleiteten Aussagen über die Alterswandlungen des Lungenbindegewebes wurden durch zusätzliche analytische Kontrollen gesichert. Durch Hydroxyprolinbestimmung des durch wässrige Extraktion unter erhöhtem Druck bei 160° gewonnenen Materials, bei dem sich die Hydroxyprolinwerte zwischen 10,2 und 11,3 % sowie Stickstoffwerte zwischen 16,8 und 17,6 bewegten, wurde die Spezifität der Kollagenbestimmung überprüft. Für die Elastinwerte wurde nicht nur das durch gravimetrische Bestimmung gewonnene Ergebnis zugrundegelegt, sondern auch die für alle Altersklassen durchgeführte Stickstoffanalyse (11,02 - 13,18 %) und die Hydroxyprolinbestimmung (1,12 - 1,27 %) berücksichtigt. Hochgereinigte Elastinpräparate enthalten 1,3 - 1,8 % Hydroxyprolin und 16,8 - 17,3 % Stickstoff. Die hier gefundenen Werte zeigen an, dass der als "Elastin" gewonnene Gewebsanteil nach Ausweis des Hydroxyprolingehaltes zwar nennenswerte Kollagenmengen nicht mehr enthält, dagegen noch durch stickstofffreie Bestandteile (Kohlenstoff, Mineralien) verunreinigt ist, die eine Korrektur auf den wirklichen Elastingehalt er-

forderlich machen. Die Elastinangaben der Tabelle 1 und 3 sind unter Berücksichtigung dieser Resultate auf den "wahren" Elastingehalt berichtigt.

Der Gesamthexosamingehalt menschlichen Lungengewebes weist - wie aus Tabelle 1 ersichtlich - eine hohe Streuung in allen Altersklassen auf. So wurden z.B. bei zwei Gewebsproben aus einer Altersklasse von 25 und 28 Jahren Schwankungen von 50 % gefunden, obwohl bei beiden Lungen die Bestimmungen mehrfach durchgeführt wurden. Die statistische Auswertung des Gesamtmaterials (Tab. 4) ergab dennoch einen Anstieg des Hexosamingehaltes mit zunehmendem Alter. Der Anstieg des Hexosamingehaltes (Glucosamin und Galaktosamin), der vor allem nach Abschluss des Körperwachstums erkennbar ist, lässt sich bei Vergleich der Altersklasse I mit den Gruppen III und IV ($p = 0{,}001$ bzw. $0{,}01$), ferner zwischen den Gruppen II und IV ($p = < 0{,}05$), nicht jedoch zwischen Gruppen III und IV statistisch sichern. Das bedeutet, dass die Menge der aminozuckerhaltigen Polysaccharide im Laufe des Lebens zunimmt, diese Zunahme jedoch auf die ersten beiden Lebensjahrzehnte beschränkt ist.

Tabelle 4

Gesamthexosamingehalt menschlichen Lungengewebes in verschiedenen Altersklassen. Angaben in % des Trockengewichtes. Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwertes (I). Mittlerer Fehler der Einzelmessung (II).

		I	II
Altersklasse	Anzahl d. Proben	Hexosamin % total	Mittlerer Fehler der Einzelmess.
I	9	0.315 ±0.020	±0.062
II	14	0.388 ±0.007	±0.099
III	14	0.545 ±0.026	±0.093
IV	26	0.439 ±0.0075	±0.130

In Abbildung 1, 2 und 3 sind die gefundenen Werte für Kollagen, Elastin und Gesamthexosamin in Abhängigkeit vom Lebensalter graphisch dargestellt.

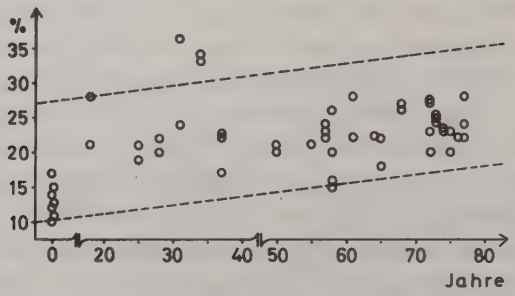

Abbildung 1

Kollagengehalt menschlichen Lungengewebes in Abhängigkeit vom Lebensalter. Einzelwerte. Ordinate: % des Trockengewichtes.

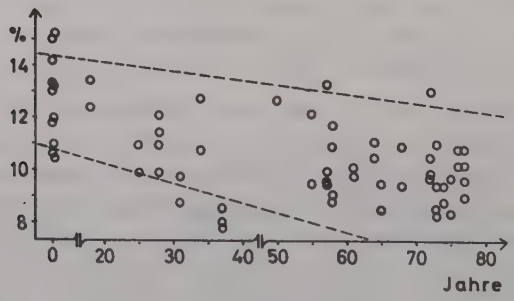

Abbildung 2

Elastingehalt menschlichen Lungengewebes in Abhängigkeit vom Lebensalter. Einzelwerte. Ordinate: % des Trockengewichtes.

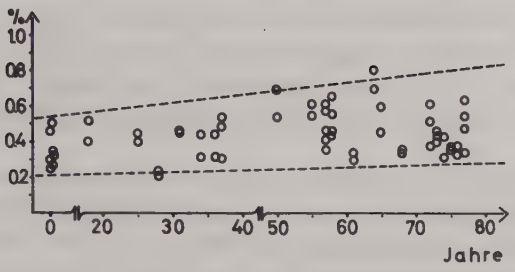

Abbildung 3

Gesamthexosamingehalt menschlichen Lungengewebes in Abhängigkeit vom Lebensalter. Einzelwerte. Ordinate: % des Trockengewichtes.

b) Saure Mucopolysaccharide und Glykoproteide [+)] (Glycosaminoglycane) des menschlichen Lungengewebes in verschiedenen Altersklassen

Der Hexosamingehalt des Lungengewebes ist nicht für eine bestimmte Klasse aminozuckerhaltiger Polysaccharide repräsentativ, sondern umfasst saure Mucopolysaccharide und neutralzuckerhaltige Gewebs- und Serumglykoproteide. Für die vorliegende Fragestellung sind die sauren Mucopolysaccharide aus verschiedenen Gründen von besonderem Interesse: einmal werden die sauren Mucopolysaccharide von den zellulären Elementen des Lungenbindegewebes selbst gebildet, sind also sind also unzweifelhaft Ausdruck einer Stoffwechselleistung des Lungengewebes und gehören zu dessen essentiellen Bestand-

---

[+)] Im anglo-amerikanischen Schrifttum als Glycoproteine, auch als neutrale Mucopolysaccharide bezeichnet. Sie unterscheiden sich von den sauren Mucopolysacchariden durch das Vorhandensein von Sialinsäure und Neutralzuckern sowie kürzere Kettenlänge und fehlende Periodizität der Kohlenhydratkomponente.

teilen. Zum anderen sind sie - schliesst man von anderen mucopolysaccharidreichen Geweben - besonders stoffwechselaktive Verbindungen, denen wesentliche funktionelle Aufgaben zugeschrieben werden, und schliesslich handelt es sich bei den sauren Mucopolysacchariden um eine Gruppe in ihrer chemischen Struktur weitgehend charakterisierter Verbindungen, so dass auch der Versuch ihrer Isolierung und Identifizierung aus menschlichen Lungen erfolgversprechend erscheint.

Bei den übrigen aminozuckerhaltigen Glykoproteiden lässt sich infolge unzureichender Charakterisierungsmöglichkeiten nicht mit Sicherheit entscheiden, inwieweit sie dem Blutplasma angehören, dessen Entfernung bei der Gewebeaufarbeitung zwar weitgehend, aber sicher nicht vollständig gelingt oder den in den meisten Geweben angetroffenen neutralzuckerhaltigen Glykoproteiden zuzuordnen sind.

In Abbildung 4 ist der proz. Gehalt an sauren Mucopolysacchariden und Glykoproteiden (bezogen auf das fettfreie Trokkengewebe) für verschiedene Altersklassen graphisch dargestellt, wobei unter der Rubrik saure Mucopolysaccharide alle im Lungengewebe vorhandenen carboxyl- und sulfathaltigen Gruppen enthalten sind, während die neutralzuckerhaltigen Glykoproteide die Summe aller übrigen aminozuckerhaltigen Verbindungen repräsentieren. Um die Altersveränderungen möglichst zuverlässig zu erfassen, wurde eine breitere Aufschlüsselung der Altersgruppen vorgenommen und das jeweils aus einem Lebensjahrzehnt stammende Untersuchungsgut getrennt in 6 verschiedenen Ansätzen unter identischen Bedingungen aufgearbeitet. Aus Gründen der direkten Vergleichbarkeit wurden ferner alle proz. Gehaltsangaben für die Ausbeuten auf einen Hexosaminwert von 10 % korrigiert. Ebenso wurde bei Bezug auf das acetontrockene Ausgangsmaterial der nach erschöpfender Proteolyse des Gewebes verbleibende, nicht lösliche Rückstand berücksichtigt. Detaillierte Angaben über den Aufarbeitungsgang finden sich anhand eines Repräsentativbeispiels (Altersklasse 31 - 37 Jahre) im Versuchsteil.

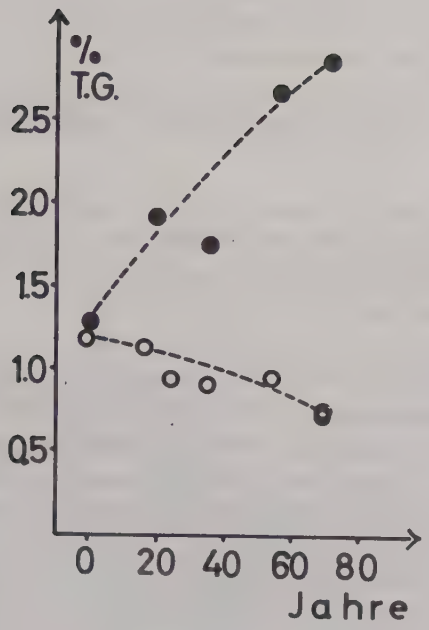

Abbildung 4

Saure Mucopolysaccharide (○) und Glycoproteide (●) menschlichen Lungengewebes in verschiedenen Altersklassen. Angaben in % des acetontrockenen Ausgangsmaterials.

Bei den Glykoproteiden sind altersabhängige Gesetzmässigkeiten ihrer Gewebskonzentration bis zum 40. Lebensjahr nicht erkennbar. Ein auffälliger Anstieg ihres proz. Anteils an Trockengewicht wird jedoch in den beiden höchsten Altersklassen beobachtet - ein Befund, der sich auch bei Nachprüfung durch eine wiederholte Aufarbeitung (2 Werte in der Alters-

klasse 61-77) bestätigte.

Über die chemische Zusammensetzung der gereinigten sauren Mucopolysaccharide und der Glykoproteide unterrichtet die Tabelle 5. Die für die sauren Mucopolysaacharide zwischen 25 und 30 % liegenden Hexosaminwerte erweisen einen guten Reinheitsgrad, obgleich es sich hier noch um ein Gemisch verschiedener Typen von sauren Mucopolysacchariden handelt.

Tabelle 5

Chemische Zusammensetzung saurer Mucopolysaccharide und Glykoproteide menschlichen Lungengewebes in verschiedenen Altersklassen. Angaben in % der isolierten Trockensubstanz.

Altersklasse	saure Mucopolysaccharide			Glykoproteide		
	Hexosamin (total)	Uronsäure (Carbazol)	N	Hexosamin (total)	Neutralzucker (Orcin)	N
0 - 1/2	24.5	20.5	3.28	6.2	14.2	10.72
18	28.6	25.0	3.75	11.4	18.7	8.16
25 - 28	27.8	23.4	3.76	4.9	13.6	10.6
31 - 37	21.2	22.4	4.58	8.8	16.6	9.91
50 - 58	18.8	22.1	4.66	10.3	19.6	8.43
61 - 77	25.1	21.2	3.48	10.6	17.9	7.85

Die Glykoproteide sind chemisch durch ihren hohen Neutralzuckergehalt (13,7 - 19,6 %) sowie das Fehlen von nennenswerten Mengen an Sulfat, Schwefel und Uronsäuren gekennzeichnet. Die Neutralzucker wurden nach Hydrolyse mit Dowex 50 (H^+Form) isoliert und als D-Galaktose, D-Mannose und L-Fucose identifiziert. Ihr Mengenverhältnis beträgt 10 : 2 : 1.

Nach vollständiger Proteolyse des Lungengewebes verbleibt ein enzymatisch nicht angreifbarer unlöslicher Rückstand, dessen Quantität bei Lungen verschiedener Altersklassen keine Beziehung zum Lebensalter erkennen lässt (7,7 - 12,2 % des Trok-

kengewebes). Nach dem Ergebnis der Stickstoffanalyse (8,41 - 10,81 %) enthält dieses Material noch beträchtliche Mengen organischer Substanz. Der Gehalt an Mineralien wurde nach trockener Veraschung bei 700° mit Werten zwischen 6,52 und 9,04 bestimmt.

c) Veränderungen des Spektrums der sauren Mucopolysaccharide menschlichen Lungengewebes in Abhängigkeit vom Lebensalter

Wie Untersuchungen anderer mesenchymaler Gewebe (Arterienwand, Knorpel) gezeigt haben, manifestieren sich messbare chemische Altersveränderungen eindeutig an den sauren Mucopolysacchariden des Bindegewebes. Die Frage analoger Vorgänge am Lungenbindegewebe verdient besondere Aufmerksamkeit, nachdem die quantitative Bestimmung der Faserproteine, Kollagen und Elastin bezüglich der Altersveränderungen zu widersprechenden Ergebnissen geführt hat (s. Einleitung). Bei der Beurteilung des Verhaltens der sauren Mucopolysaccharide des Lungenbindegewebes müssen nicht nur Änderungen ihres proz. Gehaltes, sondern vor allem eine Änderung in der Mengenkorrelation der verschiedenen Einzeltypen als Kriterien für Altersveränderungen herangezogen werden. Hierzu ist die gleichzeitige Trennung und quantitative Bestimmung der sauren Mucopolysaccharide erforderlich. In Tabelle 6 ist das Ergebnis dieser Versuche zusammengefasst. Eindeutig lässt sich eine altersabhängige Änderung in der Mengenkorrelation der Fraktion III zu Fraktion V erkennen. Der Nachweis, dass es sich bei den in Fraktion III erfassten sauren Mucopolysacchariden um Hyaluronsäure, bei den in Fraktion V erfassten um sulfatierte Polysaccharide (vorwiegend Chondroitin 4-sulfat[+]) handelt, wird in Abschnitt II d erbracht.

[+]) Nach alter Nomenklatur Chondroitinsulfat A

Tabelle 6

Säulenchromatographische Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide menschlicher Lungen in verschiedenen Altersklassen. Als Kontrollsubstanzen für die quantitative Auswertung wurden in Fraktion I Galaktose (Orcinreaktion), in Fraktion III Hyaluronat, in den Fraktionen IV und V Chondroitin 4-sulfat (Fraktion III - V Carbazolreaktion) verwendet. Säulenvolumen 15 ml, schrittweise Elution mit CPC bzw. $MgCl_2$. Die chemische Identifizierung der Fraktion I - V ist in Abschnitt II d beschrieben.

Fraktions-Nr.	Altersklasse					
	18		31 - 37		61 - 77	
	/ug	%	/ug	%	/ug	%
I (Glyko-proteide)	526	16.2	258	9.4	247	10.5
III Hya-luronat)	1331	40.8	851	31.0	640	26.9
IV (sulfat. Polysacch.)	50	1.5	22	0.8	136	5.7
V (CS-A, sulf.Polys.	1353	41.5	1613	58.8	1351	56.9
total	3260	100	2748	100	2374	100
wiedergef. in % der Einwaage	86.5		77.3		76.4	

Während der Hyaluronsäuregehalt (Fraktion III) zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr noch 40,8 % der sauren Mucopolysaccharide beträgt, sinkt dessen Gehalt bis zum 77. Lebensjahr auf 26,0 % ab. Im gleichen Zeitraum kommt es zu einem relativen Anstieg der sulfatierten Polysaccharide (Fraktion V),

die zwischen dem ersten und zweiten Lebensjahrzehnt weniger als die Hälfte, im Alter jedoch nahezu 2/3 der sauren Mucopolysaccharide stellen. Ein Hyaluronsäureschwund auf Kosten eines Chondroitinsulfatanstiegs ist hier als Altersmerkmal also deutlich ausgeprägt.

d) Isolierung, chemische Zusammensetzung und Identifizierung verschiedener saurer Mucopolysaccharide aus Lungengewebe des Menschen

Die für die einzelnen Altersklassen präparativ dargestellten (und in Tabelle 5 chemisch charakterisierten) sauren Mucopolysaccharide bildeten die Grundlage für die experimentelle Bearbeitung der Frage, welche der bisher bekannten chemisch definierten sauren Mucopolysaccharide im menschlichen Lungengewebe vorhanden sind. Die Tabellen 7 und 8 fassen das Ergebnis des im Versuchsteil näher beschriebenen Trennungsganges und der dabei gewonnenen Einzelfraktionen zusammen. Die Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide (vereinigtes Material der Altersklasse 37 - 77 Jahre) erfolgte zunächst über die Cetylpyridiniumkomplexe durch schrittweise Erhöhung der Elektrolytkonzentration, wobei 6 verschiedene in Tabelle 7 aufgeführte Fraktionen (I - VI) unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung und Reinheit gewonnen wurden. Eine graphische Darstellung ist Abbildung 5. Eine weitere Auftrennung wurde durch Säulenchromatographie an ECTEOLA-Cellulose in präparativem Maßstabe vorgenommen (Tabelle 8 und Abbildung 6).

Tabelle 7

Chemische Zusammensetzung säulenchromatographisch isolierter Einzelfraktionen der sauren Mucopolysaccharide aus menschlichem Lungengewebe. Die römischen Ziffern beziehen sich auf die bei der Trennung der CP-Komplexe gewonnenen Fraktionen.

Frakt. Nr.	% Gesamt-Polysacch.	Glucos-amin	Galakt.-amin	Uron-säure	N	S	$[\alpha]_D^{20}$	Abbau Testes-Hyalur
I	40.1	2.7	6.4	8.7	3.99	1.31		e
III	6.0	31.8	-	34.0	2.82	0.5	-41.0	+
IV	6.7	9.9	6.6	22.0	3.70	3.38		e
V	38.6	5.7	22.9	30.8	2.62	4.85	-15.0	+
VI	8.1	6.7	19.9	27.0	2.61	5.22	-14.2	e

Tabelle 8

Fraktion V/1 bis V/5 sind die durch Trennung an ECTEOLA-Cellulose gewonnenen Unterfraktionen der in Tabelle 7 aufgeführten Fraktion V.

Frakt. Nr.	Glucos-amin	Galakt.-amin	Uron-säure	S	$[\alpha]_D^{20}$	Abbau Testes-Hyalur.
V/1	4.5	24.7	28.7	4.75	-5.0	
V/2	-	29.7	32.4	5.72	-23.6	+
V/3	-	30.8	31.2	5.72	-38.5	+
V/5	-	27.6	29.5	10.4		+

Bei einer zusammenfassenden Beurteilung der in Tabelle 7 und 8 gegebenen analytischen Werte sowie der Ergebnisse der Infrarotspektren, der spezifisch optischen Drehung und der Angreifbarkeit durch Testeshyaluronidase (Abb. 7) ergeben sich folgende Aussagen: Fraktion III enthält Hyaluronsäure in reiner Form. Das ausschliessliche Vorhandensein von Glucosamin als Aminozucker, die typische optische Drehung sowie die Angreifbarkeit durch Hyaluronidase lassen keinen Zweifel an dieser Feststellung. Der Schwefelgehalt dieser Fraktion liegt an der Grenze der Erfassbarkeit und ebenso fehlen im Infrarotspektrum die typischen Sulfatbanden zwischen 800 und 850 cm^{-1} sowie bei 1250 cm^{-1}. Die Kinetik des Hyaluronidaseabbaues gleicht der eines hochgereinigten Hyaluronsäurepräparates. In den Fraktionen IV und VI sind sulfat- und z.T. glucosaminhaltige Mucopolysaccharide vorhanden. Bei ihrem nur geringen proz. Anteil an den sauren Gesamtmucopolysacchariden war eine weitere Auftrennung wenig aussichtsreich. Die Tatsache, dass keine der beiden Fraktionen durch Hyaluronidase angegriffen wurde, ist so zu deuten, dass es sich hier entweder um hyaluronidaseresistente Mucopolysaccharide (Dermatansulfat[+)], Heparin, Heparinmonosulfat) handelt oder dass deren Anwesenheit den Abbau hyaluronidaseempfindlicher Mucopolysaccharide der Fraktionen IV und VI kompetetiv hemmte, was z.B. für das Heparin erwiesen ist. Die Annahme, dass es sich bei den im ganzen nur 15 % betragenden Fraktionen IV und VI um Heparin oder Verbindungen aus der Heparinmonosulfatreihe handelt, wird durch die sehr geringen negativen Drehwerte gestützt. Auch bei der Weiterfraktionierung der Fraktion V, deren Drehwert -15° beträgt, kommt es in der das gesamte Glucosamin enthaltenden Subfraktion V/1 zu einer starken Depression des optischen Drehwertes ($-5{,}0^{\circ}$) - ein Hinweis auf die Beimengung von Mucopolysacchariden mit positiver Drehrichtung.

[+)] Nach alter Nomenklatur Chondroitinsulfat B bzw. ß-Heparin.

Fraktion I enthält gegenüber allen anderen Fraktionen wesentlich geringere Aminozuckerwerte, jedoch zusätzlich ca. 15 % Neutralzucker, die mit der Orcinreaktion erfasst wurden. Vermutlich handelt es sich um Reste nichtentfernter Glykoproteide und mit Cetylpyridiniumchlorid nicht fällbarer, teilweise sulfatierter Polysaccharid-Protein-Komplexe, deren eindeutige Identifizierung nicht möglich, aber auch von geringerer Bedeutung ist.

Die in Fraktion V erhaltene Hauptmenge der sauren Mucopolysaccharide der menschlichen Lunge entsprach nach Ausweis der Aminozuckeranalyse, die neben Galaktosamin noch 20 % Glucosamin anzeigte, noch keinem einheitlichen Polysaccharid. Erst die weitere Fraktionierung an ECTEOLA-Cellulose (Tabelle 8 und Abbildung 6) unter Verwendung von NaCl-Lösungen steigender Molarität als Elutionsmittel lieferte einheitliche Produkte (Fraktion V/1 - V/5). Nachdem das gesamte glucosaminhaltige Material mit Fraktion V/1 abgetrennt wurde, liessen sich die ausschliesslich Galaktosamin enthaltenden Fraktionen V/2 und V/3 zweifelsfrei als Chondroitin 4-sulfat identifizieren. Die spezifische Drehung, die bei Fraktion V/3 dem theoretischen Wert entspricht, war bereits ein Hinweis. Die endgültige Differenzierung zwischen Chondroitin 4-sulfat, Dermatansulfat und Chondroitin 6-sulfat[+)] wurde aufgrund der Angreifbarkeit durch Hyaluronidase und des Infrarotspektrums vorgenommen, in dem sich bei Fraktion V/2 und V/3 die typische Bande für in axialer Position befindliche C_4-Sulfatgruppen bei 855 cm^{-1} nachweisen liess, eine Absorption bei Banden von 815 - 820 cm^{-1} (C_6-Sulfat) jedoch fehlte.

In Abbildung 7 ist das Ergebnis der Hyaluronidase-Abbauversuche zusammenfassend dargestellt. Um die Effektivität der Versuchsanordnung zu prüfen, wurden Referenzpräparate von Chondroitin 4-sulfat und Hyaluronsäure unter gleichen Be-

---

+) Nach alter Nomenklatur Chondroitinsulfat C.

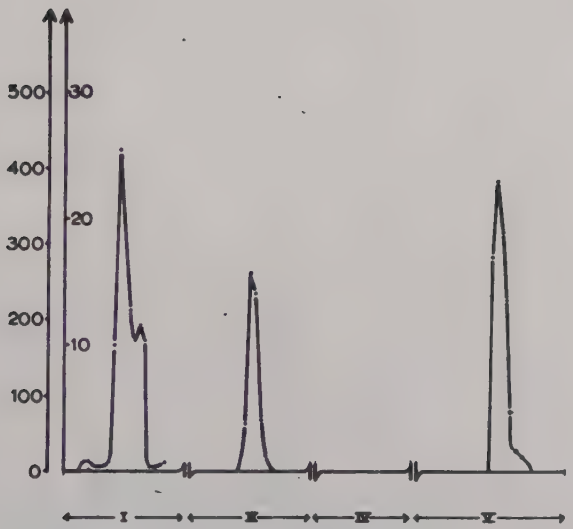

Abbildung 5

Säulenchromatographische Trennung der Cetylpyridiniumkomplexe der sauren Gesamtmucopolysaccharide aus menschlichem Lungengewebe durch schrittweise Elution mit 1 %iger Cetylpyridiniumchloridlösung bzw. Magnesiumchloridlösungen in aufsteigender Konzentration. (Fraktion II 0.1 n, Fraktion III 0.25 n, Fraktion IV 0.5 n, Fraktion V 1.5 n) Die negativen Fraktionen II und IV sind nicht mit eingezeichnet. Abszisse: Zahl der Einzelfraktionen (je 1 ml) Ordinate: Orcinreaktion zur Galaktosebestimmung (Fraktion I) bzw. Carbazolreaktion (Fraktion II bis V).

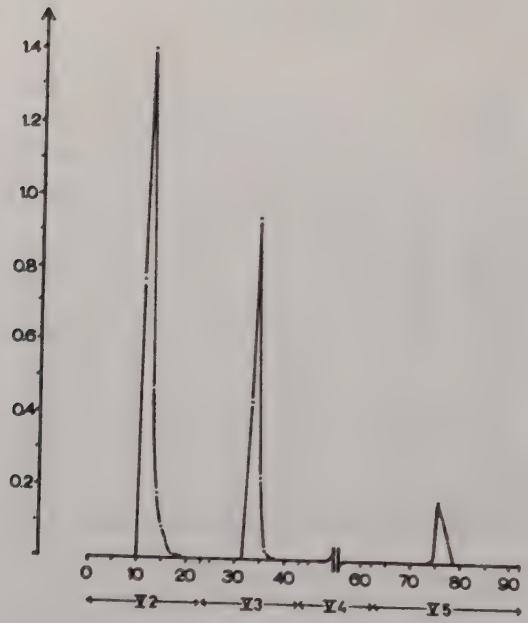

Abbildung 6

Präparative Trennung der durch Fraktionierung der Cetylpyridiniumkomplexe der sauren Gesamtmucopolysaccharide gewonnenen Fraktion V an ECTEOLA-Cellulose. Eingesetztes Material 0.181 g, Säulenvolumen 200 ml (50 x 2,5 cm). Elution mit steigenden Konzentrationen NaCl (Fraktion V/1 destilliertes Wasser, Fraktion V/2 0.05 m NaCl, Fraktion V/3 0.15 m NaCl, Fraktion V/5 1.0 m NaCl).

dingungen mitgetestet. Die Messung der durch Hyaluronsäure freigesetzten Endgruppen erfolgte über einen Zeitraum von 0 - 30 Min.. Die nur zu Beginn konstante Reaktionsgeschwindigkeit (lineare Zunahme der reduzierenden Gruppen in der Zeiteinheit) nimmt im weiteren Verlauf infolge Transhexosaminidierung und Abnahme der Affinität der Spaltprodukte zum Enzym kontinuierlich ab, Endwerte werden jedoch erst nach 48 Stdn. erreicht.

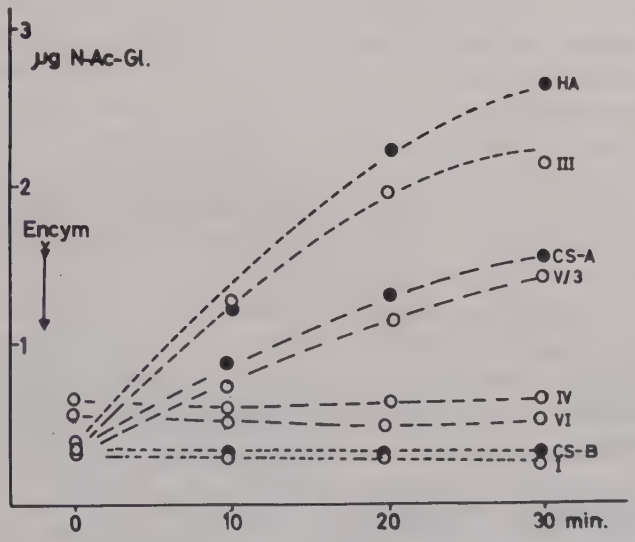

Abbildung 7

Bestimmung der durch Hyaluronidase freigesetzten Endgruppen mittels Ultramikromethodik (13). Der Reaktionsansatz (2ml) enthält 0.400 mg Substrat (Fraktion I, III, IV, V/3, VI bzw. Hyaluronat (HA), Chondroitin 4-sulfat (CS-A) und Dermatansulfat (CS-B) als Kontrollsubstanzen) und 50 E Testeshyaluronidase (Kinetin/Schering) in 0.1 n Na-Acetatpuffer (pH 6.0) mit 0.075 m NaCl. Angaben in N-Acetyl-glucosaminäquivalenten.

III. Beschreibung der Versuche

a) Untersuchungsgut

Um ausschliesslich alveoläres Lungengewebe zu gewinnen und die Mitverarbeitung grösserer Bronchialäste zu vermeiden, wurde von den - während der Sektion entnommenen - Lungen eine 3 - 5 cm dicke unter der Pleura pulmonalis liegende Schicht abgetrennt. Nach Zerkleinerung des Materials in Stücke von 0.5 - 1 cm^3 wurde zur Entfernung des Blutes sorgfältig mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschliessend in Aceton überführt. Nach mehrmaligem Wechseln des Acetons, das bis zum Verschwinden der Gelbfärbung im Lösungsmittel alle 48 Stdn. 7 - 10mal durchgeführt wurde, wurde abfiltriert und das Acetontrockengewebe im Exsiccator über Calciumchlorid bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zur Kollagen-, Elastin und Gesamthexosaminbestimmung wurden von jeder Lunge eine Repräsentativprobe von 5 g entnommen, in 1 mm^3 grosse Stücke zerkleinert und zur quantitativen Gehaltsbestimmung verwendet. Die Hauptmenge wurde nach Altersgruppen vereinigt und für die präparative Darstellung der sauren Mucopolysaccharide und Glykoproteide eingesetzt. Für diese Untersuchungen wurden 32 Gewebsproben verwendet.

b) Analytische Methoden

1. Hexosaminbestimmung

Die quantitative Bestimmung der Gesamthexosamine wurde nach der von Boas (10) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Spezifität der Hexosaminbestimmung wird bei dieser Methode dadurch gesteigert, dass vor Ausführung der colorimetrischen Reaktion nach Elson-Morgan das mit Salzsäure hydrolysierte und anschliessend über Natronlauge zur Trockne gebrachte Untersuchungsgut durch Chromatographie an einer Austauschersäule von störenden Chromogenen befreit wird. Bei einer typischen Analyse wurde folgendermassen vorgegangen und fol-

gende Werte erhalten: 15,6 mg des trockenen fettfreien Lungengewebes wurden mit 2 ml 5 n HCl in einem luftdicht verschlossenen Spitzkölbchen 4 Stdn. bei 100° hydrolysiert. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde in einem Vakuumexsiccator über konz. Schwefelsäure und Natronlauge zur Trockne gebracht, das dunkelbraune Hydrolysat in 0,3 ml dest. Wasser aufgenommen und auf eine folgendermassen vorbereitete Austauschersäule aufgetragen: eine Chromatographiesäule von 6 mm Innendurchmesser und 8 cm Länge wurde bis zu einem Volumen von 5 ml mit in 5 n HCl suspendierten Dowex 50 (H^+Form) gefüllt und mit dest. Wasser neutralgewaschen. Nach Auftragen des Hydrolysates wurde nacheinander zuerst mit 10 ml dest. Wasser und dann mit zweimal 5 ml 2 n HCl eluiert und die abgemessenen Eluatmengen in kleinen Messkölbchen aufgefangen. Zur Durchführung der Elson-Morgan-Reaktion wurden vom wässrigen und den beiden salzsauren Eluaten je 1 ml entnommen, mit 4 n NaOH gegen Phenolphthalein alkalisch gemacht und mit 0,5 n HCl bis zur Entfärbung angesäuert. Nach Zugabe einer 0.5 proz. Acetylaceton-Lösung in 2 n Sodalösung wurde nach Verschliessen der Reagenzgläser für 45 Min. in einem Wasserbad auf 90° erhitzt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden 2.5 ml Äthanol und nach Mischen im Luftstrom 1 ml Ehrlichs Aldehydreagens zugegeben. Anschliessend wurde bis auf 1 Vol. von 10 ml mit Äthanol aufgefüllt. Die nach 1 1/2 Stdn. im Spektralphotometer (Zeiss-Elko III, Filter 53) gemessene optische Dichte betrug 0,081. Anhand der gleichzeitig ermittelten Eichwerte, die für 10, 25, 50, 75 und 100 mg Glucosamin gewonnen wurden, ergab sich für die untersuchte Probe ein Hexosamingehalt von 16,2, woraus unter Berücksichtigung der Einwaage ein Gesamthexosamingehalt von 0,44 % berechnet wurde.

2. Kollagenbestimmung

Bei der Kollagenbestimmung nach Neumann und Logan (11) wird das Gewebe zunächst unter Druckerhitzung im Autoklaven mit

Wasser extrahiert, wobei das in Gelatine umgewandelte Kollagen quantitativ in Lösung geht. Der auf diese Weise gewonnene wässrige Extrakt wird auf seinen Gehalt an Hydroxyprolin untersucht und daraus durch Multiplikation mit dem Faktor 7,46 der Kollagengehalt der Gewebsprobe berechnet. Das folgende Beispiel beschreibt eine typische Kollagenanalyse: 32,0 mg Trockengewebe wurden in einem mit einer Kapillare versehenen Zentrifugenröhrchen mit 5 ml dest. Wasser 4 Stdn. im Autoklaven unter einem Druck von 6 at. bei 164° erhitzt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde der wässrige Extrakt abgetrennt und noch zweimal mit je 5 ml dest. Wasser in gleicher Weise extrahiert. Die vereinigten wässrigen Lösungen wurden bei 110° eingedampft, mit 1 ml 6 n HCl 24 Stdn. bei 110° hydrolysiert. Das erhaltene Hydrolysat wurde in einem Messkolben auf 200 ml mit dest. Wasser verdünnt, filtriert und 1 ml des Filtrates zur Hydroxyprolinbestimmung verwendet. Hierzu wurden nacheinander 1 ml 0,01 m Kupfersulfat, 1 ml 2,5 n NaOH und 1 ml 6 proz. Wasserstoffperoxydlösung zugegeben, sorgfältig gemischt und 5 Min. unter gelegentlichem Umschütteln im Wasserbad auf 80° erhitzt. Nach Abkühlen im Eiswasser wurden 4 ml einer 3 n Schwefelsäure und 2 ml einer 5 proz. Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in n-Propanol zugegeben und 16 Min. im Wasserbad auf 70° erhitzt. Nach Abkühlen in Leitungswasser wurde bei 450 nm photometriert. Anhand der gleichzeitig angefertigten Eichwerte mit authentischem Hydroxyprolin und des für die Probe ermittelten Extinktionswertes von 0,045 wurde ein Kollagengehalt von 21,4 % für die Trockensubstanz berechnet.

3. Elastinbestimmung

Der nach der Kollagenextraktion verbleibende Rückstand wurde 45 Min. bei 95° mit 0,1 n NaOH behandelt. Nach Entfernung der Natronlauge wurde der Rückstand bis zur Neutralität mit dest. Wasser gewaschen und anschliessend durch Übergiessen mit reichlich Aceton und Wechsel des Acetons in Trok-

kengewebe überführt. Nach Trocknung im Exsiccator bis zur Gewichtskonstanz wurde das Trockengewicht ermittelt (3,19 mg) und eine Stickstoffbestimmung durchgeführt. Der aus der gravimetrischen Bestimmung erhaltene Elastinwert von 9,88 % des Trockengewebes wurde anhand der N-Analyse auf den wahren Elastingehalt korrigiert.

4. Isolierung der Gesamtmucopolysaccharide:

Die Darstellung der Gesamtmucopolysaccharide aus acetontrokkenem Lungengewebe wurde für 5 verschiedene Altersklassen unter identischen Bedingungen durchgeführt. Das nachfolgende Beispiel eines Aufarbeitungsganges bezieht sich auf die Altersgruppe 31 - 37 Jahre: 53,0 g Acetontrockengewebe wurden in 500 ml einer Enzympufferlösung (0,1 m Natriumacetat, 0,005 Cystein-HCl, 0,005 m Äthylendiamintetraacetat und 0,5 % Papain (Merck) suspendiert, 24 Stdn. bei 65° inkubiert und das Ungelöste in gleicher Enzympufferlösung erneut für 24 Stdn. belassen. Der danach verbleibende Rückstand wurde zweimal mit 0,1 m Natriumacetatlösung und mit dest. Wasser und Aceton gewaschen (4,1 g). Die vereinigten Digestionslösungen wurden 24 Stdn. gegen fliessendes Wasser dialysiert, mit der 5fachen Menge Äthanol gefällt und noch zweimal nach Lösen des Präzipitates in wenig Wasser bei pH 10 bzw. pH 3 umgefällt. Das nach der 3. Fällung erhaltene Präzipitat wurde in wenig dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet (2,78 g Gesamtmucopolysaccharide).

5. Saure Mucopolysaccharide

Die nachfolgend beschriebenen Äthanolfällungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit dem 2 1/2fachen Volumen 98 proz. Äthanol nach Zusatz von 1 % Kaliumacetat (Endkonzentration) durchgeführt. 2,78 g Gesamtmucopolysaccharide wurden in 30 ml 90 proz. Phenol unter kräftigem Schütteln 12 Stdn. extrahiert, zentrifugiert und zweimal mit Phenol gewaschen. Der unlösliche Rückstand wird in 0,1 n Natriumacetat gelöst, mit Äthanol gefällt (0,7811 g), erneut in dest.

Wasser gelöst, 1 Std. bei 78 000 x g zentrifugiert und mit Äthanol gefällt. Nach Waschen und Trocknen wurden 0,587 g mit einem Hexosamingehalt von 7,1 % gewonnen. Zur weiteren Reinigung wurden 0,100 g in 5 ml dest. Wasser gelöst, mit 12,5 ml 2,5 proz. wässriger Cetylpyridiniumchloridlösung gelöst, gegen dest. Wasser dialysiert und als Kaliumsalz mit Äthanol gefällt (29,5 mg, Analyse s. Tabelle 5).

6. Glykoproteide

Die unter III/4 gewonnenen Phenolextrakte wurden mit der 5fachen Menge Äthanol versetzt, das Präzipitat zweimal mit Äthanol und dann mit Äther bis zur Phenolfreiheit gewaschen, getrocknet, erneut in dest. Wasser gelöst, dialysiert, 1 Std. bei 78 000 x g zentrifugiert und mit Äthanol gefällt (0,702 g, Analysen s. Tabelle 5).

7. Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide

1,103 g saure Mucopolysaccharide (vereinigtes Material der Altersklassen 18 - 77 Jahre) wurden in 100 ml dest. Wasser gelöst und in 100 ml einer 2 proz. wässrigen Cetylpyridiniumchloridlösung, die 100 ml Cellulosepulver (Nassvolumen enthielt, unter Rühren eingetropft und über Nacht stehengelassen. Nach Zentrifugieren wurde der Ansatz dreimal nacheinander mit je 50 ml einer 1 proz. Cetylpyridiniumchloridlösung (Fraktion I), 0,1 n, 0,25 n (Fraktion III), 0,5 n (Fraktion IV), 1,5 n (Fraktion V) und 2,0 n (Fraktion VI) Magnesiumchloridlösung gewaschen. Nach Fällung mit Äthanol wurde in dest. Wasser gelöst, zweimal 24 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert, 1 Std. bei 78 000 g zentrifugiert und mit Äthanol gefällt. Es wurden erhalten in Fraktion I 262,3 mg, Fraktion III 39,6 mg, Fraktion IV 43,5 mg, Fraktion V 252,9 mg und Fraktion VI 52,6 mg (Analysen in Tabelle 7).

8. ECTEOLA-Cellulose-Chromatographie

Zur Trennung an ECTEOLA-Cellulose wurde eine Chromatographiesäule (50 x 2,5 cm) bis zu einem Volumen von 200 ml mit in

Wasser suspendierter ECTEOLA-Cellulose beschickt, nacheinander mit je 500 ml 0,5 n HCl, 0,5 n NaOH und dest. Wasser bis zur Neutralität gewaschen. 0,186 g der durch die Detylpyridiniumchlorid-Trennung gewonnenen Fraktion V wurden in 100 ml dest. Wasser gelöst, auf die Säule aufgetragen und nacheinander mit je 400 ml dest. Wasser (Fraktion V/1), 0,05 m NaCl (Fraktion V/2), 0,15 m NaCl (Fraktion V/3), 0,25 m NaCl und 1.00 m NaCl (Fraktion V/5) eluiert und in Proben zu je 20 ml aufgefangen. Die carbazolpositiven Einzelfraktionen jeder Hauptfraktion wurden vereinigt, mit Äthanol gefällt und nach Lösen, Dialysieren und Zentrifugieren bei 78 000 x g mit Äthanol gefällt (Fraktion V/1 = 45,0, Fraktion V/2 = 40,63, Fraktion V/3 = 25,16, Fraktion V/5 = 6,35 mg. Analysen in Tabelle 8).

IV. Diskussion

Die morphologische Grundstruktur der Lungen besteht aus einem fibrillären Bindegewebe, an dessen chemischen Aufbau die Faserproteine Kollagen und Elastin wesentlichen Anteil haben. Es wurde daher versucht, das Mengenverhältnis dieser beiden Skleroproteide, das beim Menschen nach Abschluss des Körperwachstums etwa 3 : 1 beträgt, als Kriterium für Altersveränderungen heranzuziehen. In unseren Untersuchungen erweist sich das Kollagen als eine relativ konstante altersunabhängige Grösse. Bei der Diskussion der Altersveränderungen des Elastins müssen jedoch die erheblichen sowohl den morphologischen wie auch den chemisch-analytischen Sektor betreffenden Diskrepanzen der bereits vorliegenden Untersuchungsergebnisse berücksichtigt werden. So steht z.B. das Ergebnis feingeweblicher Untersuchungen, wonach die elastischen Fasern im Alter "fraktioniert und abgebaut" werden oder eine "diffuse und uniforme Atrophie der elastischen Fasern" einsetzt "12), im Gegensatz zu der Beobachtung, dass eine altersbedingte zahlenmässige Abnahme der elastischen Fasern in den Alveolen nicht nachweisbar sei (2). Ebenso gegensätzlich sind die Resultate chemischer Altersbestimmungen, bei denen einerseits ein progressiver Anstieg des Elastingehal-

tes mit dem Lebensalter (10 bis 20 J. = 3,9 %, 79 bis 94 J. = 13,5 %) (4), andererseits jedoch eine signifikante Abnahme (5) (Rückstand nach Extraktion des Gewebes im Autoklaven) beschrieben wurde. Diese Differenzen sind sicher teilweise durch Unterschiede bei der Auswahl des Untersuchungsgutes bedingt, beruhen jedoch ebenfalls auf methodischen Unzulänglichkeiten der Elastinbestimmung. Die hier gefundene Abnahme des Elastingehaltes steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Untersucher, die unter methodisch gleichartigen Voraussetzungen gewonnen wurden (5). Sie erklärt zudem die anerkannte Abnahme der Lungenelastizität mit zunehmendem Lebensalter.

Das chemische Korrelat der strukturlosen Grundsubstanz mesenchymaler Gewebe bilden saure Mucopolysaccharide, Glykoproteide und Proteine. Unter den sauren Mucopoylsacchariden des Lungengewebes machen Chondroitinsulfat und Hyaluronat zusammen über 80 % aus, während weitere sulfatierte und glucosaminhaltige Polysaccharide, die vermutlich dem Heparin oder der Heparinmonosulfatreihe angehören, in nur geringer Quantität gefunden wurden. Dieses Mengenverhältnis der sauren Mucopolysaccharide untereinander entspricht ihrer funktionellen Bedeutung: während Chondroitsulfat und Hyaluronsäure als "Strukturpolysaccharide" selbst wesentlichen substantiellen Anteil am Gewebeaufbau besitzen und dabei als hydratisierte Makromoleküle Permeabilitäts- und Diffusionsvorgänge im Extrazellulärraum beeinflussen oder mechanische Funktionen bei der Expansion und Retraktion des elastischen Fasernetzes wahrnehmen, entfalten die höher sulfatierten Polysaccharide vom Typ des Heparins oder Heparinmonosulfats als "Wirkstoffpolysaccharide" ihre Aktivität in sehr viel geringerer Konzentration. Durch Eingreifen in die Vorgänge der Gerinnung, der Lipaemieklärung oder als Cofaktoren enzymatischer Reaktionen werden sie zu Stoffwechseleffektoren, deren Bedeutung für den Lungenstoffwechsel noch nicht in vollem Umfang bekannt ist. Obgleich Chondroitinsulfat und Hyaluronat auch in tierischen Lungen neben Heparin und Dermatansulfat nachgewiesen

wurden, liegen vergleichbare Angaben über ihr Mengenverhältnis nicht vor. Der Anteil an Dermatansulfat an einem Polysaccharidgemisch aus Rinderlunge betrug jedoch nur 2 % (8, 9).

Dass es im Rahmen der Alterswandlungen des Bindegewebes zu einer Abnahme der Gewebskonzentration der sauren Mucopolysacchariden kommt, ist bereits für Knorpelgewebe (13) bekannt und trifft nach den vorliegenden Feststellung auch für das Lungengewebe zu. Eine spezielle Interpretation der Hyaluronsäureabnahme ergibt sich aus dem synchronen Elastinschwund. Folgt man der Hypothese, dass die Hyaluronsäure als hochviskoses Gleitmittel die zwischen den elastischen Fasern auftretenden Reibungskräfte auffängt, so müssen Abnahme des Elastingehaltes und Hyaluronsäureverlust erwartungsgemäss korrespondierende Prozesse sein. Ein analoger Alterungsprozess vollzieht sich im Arterienbindegewebe (14). Die vorliegenden Ergebnisse zur Bestimmung des Hyaluronsäure/Chondroitinsulfat-Quontienten lassen damit ein typisches Altersmerkmal auch für das Lungenbindegewebe erkennen.

Zusammenfassung

Untersuchungen am Bindegewebe menschlicher Lungen in verschiedenen Altersklassen hatten folgende Ergebnisse:

Als Faserproteine enthält das Lungenbindegewebe Kollagen und Elastin. Der Kollagengehalt steigt in den ersten beiden Lebensdezennien von durchschnittlich 12 auf ungefähr 24 % des Trockengewichtes und bleibt dann bis zum 7. Lebensjahrzehnt annähernd konstant. Der Elastingehalt nimmt im Laufe des Lebens kontinuierlich von 8,4 auf 6,9 % des Trockengewichtes ab. Diese altersbedingten Veränderungen sind statistisch gesichert.

Die Interzellularsubstanz des Lungengewebes enthält als Kohlenhydratkomponente saure Mucopolysaccharide und Glykoproteide. Die sauren Mucopolysaccharide bestehen zu 40 bis 60 % aus Chondroitinsulfat und zu 20 - 40 % aus Hyaluronsäure. Beide Polysaccharide konnten in reiner Form isoliert werden. Glucosaminhaltige und sulfatierte, durch Testeshyaluronidase nicht angreifbare Polysaccharide fanden sich zu 10 % der Gesamtpolysaccharide. Die Altersveränderungen der sauren Mucopolysaccharide lassen sich durch Abnahme ihres prozentualen Anteils am Trockengewebe und durch die Änderung des Hyaluronsäure/ Chondroitinsulfatquotienten kennzeichnen.

Die Glykoproteide enthalten neben dem Hexosaminanteil von 5 - 11 % als Neutralzucker D-Galaktose, D-Mannose und L-Fucose in einem Verhältnis von 10 : 2 : 1. Mit höherem Lebensalter wurden auch höhere Gewebskonzentrationen an Glykoproteiden gefunden.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. W. Bargmann, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 3. Aufl. G. Thieme, Stuttgart (1959).
2. G. Hieronymi, Erg. allg. Path. path. Anatomie 41, 1 (1961).
3. J.A. Pierce, J.B. Hocott, J. Clin. Invest. 39, 8 (1960).
4. N. Scarselli u. M. Repetto, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper 35, 191 (1959).
5. R.J. Boucek, N.L. Noble u. A. Marks, Gerontologia 5, 150 (1961).
6. A.M. Briscol u. W.E. Lorning, Proc. Soc exp. Biol. Med. 99, 162 (1958).
7. M. Chvapil, Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg. 18, 556 (1961).
8. R. Marbet u. A. Winterstein, Hel. Chim. Acta 34/2, 2311 (1951)
9. K. Tokita, Tohoku, J. Exptl. Med. 66, 251 (1957).
10. N.F. Boas, J. biol. Chemistry, 204, 553 (1953).
11. R.E. Neumann u. M.A. Logan, J. biol. Chemistry, 184, 299 / (1950).
12. R.R. Wright, Am. J. Pathology 39, 355 (1961).
13. D. Kaplan u. K. Meyer, Nature, 183, 1267 (1955).
14. E. Buddecke, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chemie 318, 33 (1960).

L e b e n s l a u f

Ich, Elvira Ruff, geb. Lichtenstein, wurde am 11.11.1938 in Dresden als erstes Kind des Rechtsanwaltes Dr. Erich Lichtenstein und seiner Frau Olga, geb. Menzinger, geboren. 1947 gelangten wir nach Stuttgart, wo ich 1957 am Mörike-Gymnasium die Reifeprüfung ablegte. Anschliessend studierte ich an der Universität Tübingen. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich 1958, die ärztliche Vorprüfung 1960. Im Dezember 1960 heiratete ich und zog im Frühjahr 1961 nach München um. 1962 kam ich nach Tübingen zurück, wo ich im Dezember 1964 die ärztliche Prüfung bestand.

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen